

分泌 IL-4、IL-10 等。Th1 型和 Th2 型细胞互相抑制彼此表型的分化和功能。研究结果表明, 在产生急性排斥的移植器官中检测到大量的 Th1 型细胞因子存在, 而在产生耐受的移植器官中可检测到 Th2 细胞因子占优势^[12-14]。宿主腹腔淋巴结的 IL-2mRNA 的表达水平中, CsA 组较对照组为低, 而以 CsA+DC 组的 Th1 型细胞因子 IL-2mRNA 表达最低($P<0.05$)。Th2 型细胞因子 IL-4mRNA 的表达 CsA 组低于对照组, CsA+DC 组则明显高于对照组($P<0.05$), 并维持在较高的水平上。说明 CsA 的作用只是抑制了 T 淋巴细胞的激活和向 Th1/Th2 细胞的分化, 从而抑制了宿主的免疫排斥反应, 但不能改变宿主淋巴细胞中 Th1 细胞与 Th2 细胞的比例, 一旦药物作用消失, T 淋巴细胞依然能被激活、增生、分化产生免疫排斥反应。CsA+DC 组的宿主免疫期器官中则明显以 Th2 细胞占优势, 说明输注体外培养的供体特异的 DC_{im} 是通过调节免疫器官中的 Th1/Th2 细胞的比例, 使宿主体内的 Th2 淋巴细胞升高, 抑制 Th0 细胞向 Th1 型淋巴细胞分化, 从而调低宿主的急性免疫排斥反应。

Th2 细胞主要通过以下几点降低宿主的免疫排斥反应: 急性免疫排斥反应的效应细胞 T_{DTH}, CTL 需要 Th1 细胞分泌的细胞因子 IL-2, IFN- γ 的刺激激活, Th2 细胞因子可以抑制 Th1 克隆的增生和阻断 Th0 向 Th1 细胞分化。急性排斥反应的效应细胞 T_{DTH}, CTL 细胞的分化成熟都需 IL-12 调节^[15], Th2 型细胞因子还可通过调节 APC 分泌的细胞因子, 特别是抑制 IL-12 的产生来调节 CD4, CD8 细胞的成熟及分化。这些活化的 Th2 细胞一部分可分化成记忆性 T 淋巴细胞, 在体内长时间存在, 即使免疫抑制剂的作用消失仍然能特异性调低宿主对供体抗原的免疫排斥反应并维持较长一个时期。

4 参考文献

- 1 Williams JW, Peters TG, Vera SR, Britt LG, van Voorst SJ, Haggitt RC. Biopsy-directed immunosuppression following hepatic transplantation in man. *Transplantation* 1985; 39:589-596
- 2 Mcknight AJ, Barclay AN, Mason DW. Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1991;21: 1187-1194
- 3 吴开胤, 孙桂芝, 周同, 陈楠. 协同刺激分子与疾病. *生命科学* 2003;15:299-303
- 4 李颖, 段德义, 杨慧. 抑制移植免疫排斥反应的研究进展. *中国生物工程杂志* 2003;23:28-31
- 5 张临友, 李刚. 嵌合与移植. *国外医学·免疫学分册* 2000;23: 39-42
- 6 Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Ostrowski L, Flynn B, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transplant* 2003; 3:689-696
- 7 Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003;52:307-314
- 8 戴盛明, 杨春旭. 树突状细胞异质性研究进展. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2001;21:325-327
- 9 Chiang YJ, Lu L, Fung JJ, Qian S. Liver-derived dendritic cells induce donor-specific hyporesponsiveness: use of sponge implant as a cell transplant model. *Cell Transplant* 2001;10: 343-350
- 10 Otto C, Ohrlein E, Meyer D, Timmermann W, Gassel HJ, Thiede A, Ulrichs K. Detection of dendritic cells with down-regulated CD80/CD86, but normal MHC classII expression after rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33:442-444
- 11 Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1 Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-146
- 12 宋子军, 杨占宇, 董家鸿. Th1/Th2 细胞与移植免疫耐受. *世界华人消化杂志* 2001;9:794-796
- 13 陈晋. 延长移植存活分子策略的一些进展. *国外医学·免疫学分册* 2002;25:117-119
- 14 Gao Q, Chen N, Rouse TM, Field EH. The role of interleukin-4 in the induction phase of allogeneic neonatal tolerance. *Transplantation* 1996;62:1847-1854
- 15 Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cell. *J Exp Med* 1997;185:817-824

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

诱导型一氧化氮合酶基因启动子 -969G \rightarrow C 多态性的功能

程元桥, 林菊生, 王文琦, 廖家智, 姜晓丹, 冯 玮, 熊 平

程元桥, 王文琦, 广东省东莞市人民医院感染科 广东省东莞市 523018
林菊生, 廖家智, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科
湖北省武汉市 430030
姜晓丹, 冯玮, 熊平, 华中科技大学同济医学院免疫研究所
湖北省武汉市 430030

项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 2239 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2002@yahoo.com.cn
电话: 027-83662688-3595

收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-04-29

摘要

目的: 探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因启动子-969G \rightarrow C 多态性的功能意义。

方法: 采用聚合酶链反应(PCR)扩增已知的 iNOS 基因启动子-969G \rightarrow C 多态性的 GC 和 GG 基因型启动子 DNA 序列,

再采用基因重组技术将获得的启动子与PGVB-2-E荧光素酶载体质粒连接,构建新的重组质粒pPGV-iNOSmt和pPGV-iNOSwt,并进行酶切图谱分析和测序分析.然后将重组质粒分别在脂质体的介导下转染HepG2细胞,检测荧光素酶的表达水平,分析不同基因型启动子的活性差异.

结果:成功构建iNOS基因-969G→C多态性的GC和GG基因型启动子荧光素酶载体重组质粒pPGV-iNOSmt和pPGV-iNOSwt,发现iNOSmt启动子的活性比对照启动子的活性显著升高,升高132.1%,差异有显著性($P<0.05$),iNOSwt启动子的活性比对照启动子的活性升高14.3%,差异无显著性($P>0.05$).iNOSmt启动子活性升高的百分率是iNOSwt启动子的9倍.

结论:iNOS基因启动子-969G→C的多态性改变导致该启动子的活性增强.

程元桥,林菊生,王文琦,廖家智,姜海丹,冯玮,熊平.诱导型一氧化氮合酶基因启动子-969G→C多态性的功能.世界华人消化杂志 2004;12(9):2219-2222
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2219.asp>

0 引言

诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)基因启动子是已知最大最复杂的启动子之一,他的表达受精密复杂的调控.遗传易感性对基因的功能影响可表现在几个方面,其中基因启动子突变后可直接影响他的功能活性,表现为功能增强或减弱,所表达的蛋白水平也可发生改变.基础研究发现iNOS基因启动子-969处有G→C的多态性.然而,这一多态性的功能意义尚不清楚.我们构建iNOS基因启动子-969G→C多态性的不同基因型启动子的荧光素酶报道重组质粒,瞬时转染HepG2细胞,分别测定荧光素酶的活性,以研究iNOS基因启动子-969G→C多态性的功能.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌DH5 α 菌株和HepG2细胞株由武汉同济医院肝病研究所细胞室保存;荧光素酶报道基因质粒PGV-B2(4 818 bp)及PGV-B2-E质粒(6 391 bp)由日本熊本大学医学院心血管系Hirofumi Yasue教授惠赠;限制性内切酶Kpn I, Xho I, T4DNA连接酶(Promega);高保真TaqDNA聚合酶(Pfu);LB培养基(Gibco);质粒提取试剂盒,低熔点琼脂糖,脂质体Lipofectin(Promega), β -肌动蛋白驱动 β -半乳糖苷酶报道质粒(Pan Vera Corp);荧光素酶检测试剂盒, β 半乳糖苷酶检测试剂盒(Promega);PCR仪(Perkin Emer),恒温水浴箱,低温高速离心机,恒温震荡培养摇床;CO₂细胞培养箱(德国 Heraeus),超净工作台,倒置显微镜(日本 Nikon),细胞计数器,荧光分光光度计F-4500(日本 Hitachi)等.

1.2 方法 从GenBank下载人iNOS基因全部序列(GenBank accession, L09210),设计启动子引物时,

在两端分别接上KpnI酶切序列GGTACC, XhoI酶切序列CTCGAG.上游序列为S: 5' -GACGGTACCGAAG GAAATGAGTGGACAGTGG-3' (7 086-7 107),下游序列为AS: 5' -GACCTCGAGAACAGTCAAACCAGGAAGAGACC-3' (8 453-8 431).由上海生工公司合成.

1.2.1 重组质粒的构建筛选与鉴定 模板DNA来自iNOS基因启动子-969G→C多态性GG和GC基因型患者DNA. PCR反应预变性94℃ 4 min,主循环变性94℃ 50 s,退火41℃ 1 min,延伸72℃ 1 min 30 s, 23循环.最后72℃延伸5 min. 2%琼脂糖(含EB)电泳鉴定片段大小.用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收纯化PCR产物,得到iNOSwt和iNOSmt启动子片段.常规法制备感受态DH5 α 细菌,转化PGV-B2-E质粒后大量制备质粒.再将PCR获得的启动子片段和PGV-B2-E载体质粒分别用Xho I和Kpn I酶切,回收纯化.最后将不同的启动子片段分别与PGV-B2-E质粒载体片段在T4 DNA连接酶的作用下连接,得到构建的含启动子荧光素酶重组质粒pPGV-iNOSwt和pPGV-iNOSmt.将重组质粒pPGV-iNOSwt和pPGV-iNOSmt分别转化感受态细菌DH5 α ,阴性对照以TE替代连接产物.阳性对照以PGV-B2-E质粒替代连接产物.挑选中等大小的Amp抗性菌落,接种于含Amp的LB液体培养基中振荡培养过夜.用质粒小量制备试剂盒抽提质粒,行PCR鉴定及酶切分析鉴定.获得阳性克隆.将iNOS基因启动子PCR扩增产物及选择经酶切和PCR鉴定阳性的重组质粒pPGV-iNOSwt和pPGV-iNOSmt,送上海生物工程公司测序分析,以证实构建成功.

1.2.2 脂质体介导的质粒转染细胞 选择已鉴定的重组质粒pPGV-iNOSwt和pPGV-iNOSmt阳性菌落,细菌扩增后大量制备转染质粒,溶于TE 50 μ L, -20℃保存.采用脂质体Lipofectin介导的转染技术,将重组质粒转染HepG2细胞,并与 β -肌动蛋白驱动 β -半乳糖苷酶报道质粒220 ng共转染,作为内对照,以控制转染效率.室温下放置30 min,以便形成DNA-脂质体复合物.阳性对照组加PGV-B2-E质粒.阴性对照组加PGV-B2质粒.将转染质粒的细胞培养28 h检测.转染的细胞经3次冻融裂解(-80℃ 30 min, 室温10 min)后,裂解的细胞液转移至离心管,离心.取上清,按荧光素酶检测说明书加样.用荧光分光光度计测定20 s内的光输出量. β -半乳糖苷酶的检测按说明书执行,用分光光度计在410 nm处测定A值.

统计学处理 所获的数据用均值 \pm 标准差表示.荧光素酶活性用裂解细胞提取物中每克蛋白荧光素光亮度light u/g表示.启动子活性用标准化相对光单位(NRLU)代表.标准化相对光单位/ A410=同一细胞提取物测得的平均荧光素酶活性/ β -半乳糖苷酶活性.采用Bonferroni方法进行统计处理, $P<0.05$ 则有统计学意义.

2 结果

2.1 PCR扩增目的片段的结果 应用PCR技术扩增iNOS基因启动子的全长达1 385 bp, 分别获得含iNOS基因野生和突变的启动子目的片段. 由于扩增的目的片段较长, 在PCR过程中易出现碱基错配, 所以采用了高保真Taq DNA聚合酶(Pfu). 在实验初期, PCR扩增经历了多次的失败. 经查阅文献和回顾设计引物的过程及改进实验程序, 终于扩增出所需的基因片段(图1).

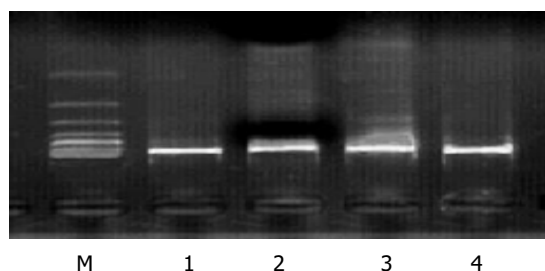


图1 iNOS基因启动子PCR扩增结果. M: PCR Marker (237–1 543 bp), 1–4: PCR产物1 385 bp.

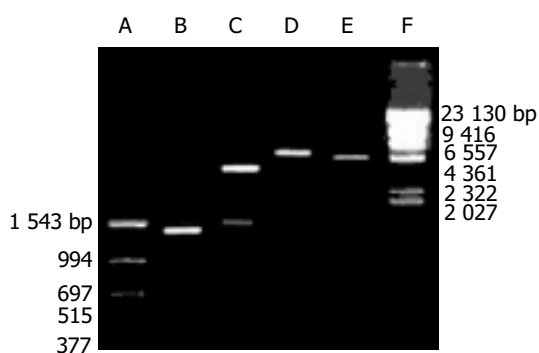


图2 重组质粒的酶切PCR鉴定结果. A: PCR Marker (377–1 543 bp); B: 重组质粒PCR; C: 质粒经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切; D: 重组质粒经 *Kpn* I 单酶切; E: 空质粒经 *Kpn* I 单酶切; F: DNA Marker (λ DNA/Hind III).

2.2 重组质粒 将所构建的重组质粒经单酶切(*Kpn* I)、

双酶切(*Kpn* I 和 *Xho* I)及质粒PCR扩增产物, 用1%的琼脂糖电泳(图2). 构建的重组质粒pPGV-iNOS经双酶切后呈现1 373 bp 和4 765 bp 两条片段, 单酶切为呈现6 138 bp 的一条带. 空质粒PGB-B2-E单酶切为6 391 bp 的一条带. B泳道的产物约为1 kb, 与预计相符; C泳道的短片段于B泳道一致, 长片段与E泳道的产物一致, 而D泳道的产物稍落后于C和E泳道, 说明其长度大于5 kb. 结果证实iNOS基因启动子荧光报道重组质粒pPGV-iNOSwt 和 pPGV-iNOSmt 构建成功. 将测序碱基序列以Blast 的基因格式调入GeneBank 比较, 经Sequencer 软件分析, pPGV-iNOSwt 和 PGV-B2-iNOSmt 的送检序列与GenBank 查询结果完全一致. 说明重组质粒pPGV-iNOSwt 和 pPGV-iNOSmt 构建成功. 图3 为部分测序的结果.

2.3 启动子功能活性分析 将启动子活性用标准化相对光单位(NRLU)表示. 启动子iNOSmt 的活性为 6.5×10^4 , 与对照基因启动子 B2-E 的活性相比显著升高, 升高132.1%, 差异有显著性($P < 0.05$). 启动子iNOSwt 的活性为 3.2×10^4 , 与对照基因启动子 B2-E 的活性相比升高14.3%, 差异无显著性($P > 0.05$). iNOSmt启动子活性升高的百分率是iNOSwt 启动子的9倍.

3 讨论

基因启动子为DNA链上能与RNA聚合酶结合并能起始mRNA 转录的序列, 是基因表达不可缺少的重要调控序列. 启动子位于结构基因的5' 端, 只能近距离起作用, 有方向性, 空间位置恒定, 是转录起始的基本信号结构, 决定基因的转录效率. 因此, 当基因启动子DNA链上的碱基发生突变或插入缺失, 可影响基因的转录调控功能. 研究启动子的功能变化, 最常用的方法是构建启动子重组体质粒-瞬时转染分析法. 我们成功构建

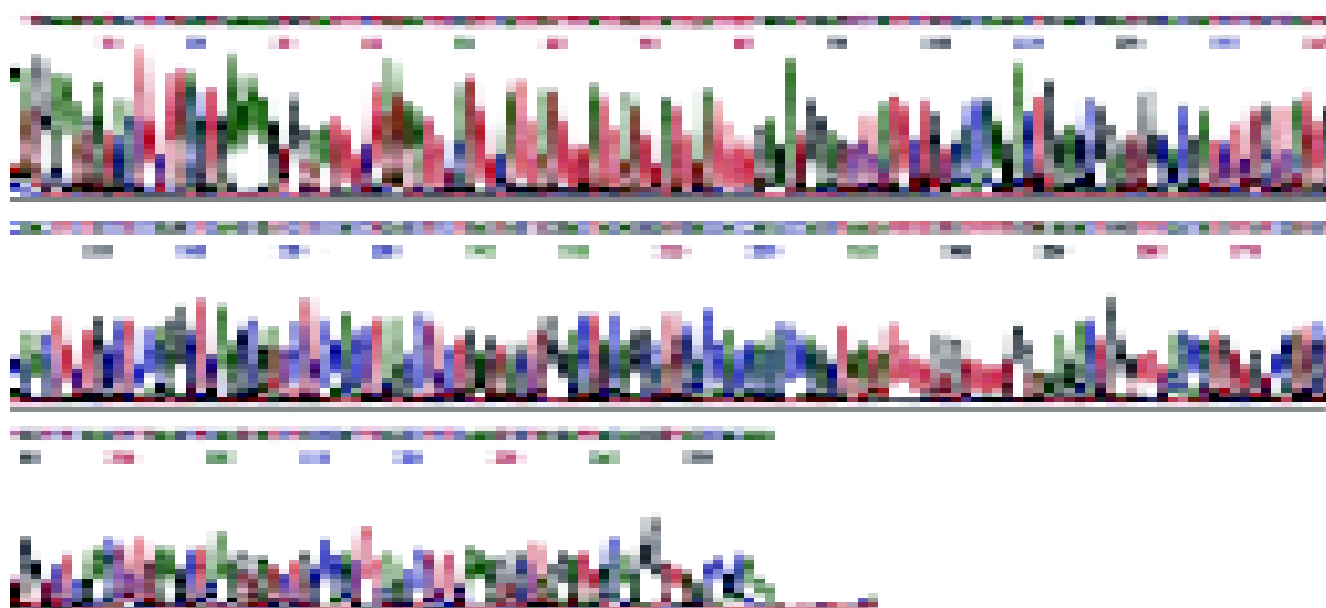


图3 部分iNOS基因启动子测序.

的iNOS基因启动子-969位点多态性的荧光素酶报道基因重组质粒 pPGV-iNOSwt 和 pPGV-iNOSmt, 用脂质体介导法转染人肝癌细胞株 HepG2, 研究 iNOS 基因启动子-969G→C多态性的不同基因型启动子的功能活性差异. 结果发现启动子iNOSmt的活性比对照基因启动子B2-E的活性显著升高, 差异有显著性. 启动子iNOSwt的活性比对照基因启动子B2-E的活性稍高, 差异无显著性. 表明 iNOS 基因启动子 -969G→C 的多态性导致该启动子的功能活性增强, GC 基因型携带者比 GG 基因型携带者可能有更强的 iNOS 表达.

Jurgen *et al*^[1]在 1998 年研究儿童严重疟疾患者与 iNOS 基因启动子-969G→C 的多态性的关系中, 发现杂合子 GC 的频率为 17%, 轻度疟疾患者杂合子 GC 的频率为 30%, 认为这种频率的差异与 iNOS 基因启动子-969G→C 的突变后对疟疾产生抵抗有关. 他们推测杂合子 GC 基因型患者可能产生大量的 NO, 对疟疾具有杀伤作用. 本结果初步证实了 Jurgen *et al* 的推测, iNOS 基因启动子-969G→C 的多态性导致该启动子的功能活性增强, 产生大量的 NO, 发挥效应. 最近 Morris *et al*^[2]报道在 iNOS 基因启动子-756 到 -716 位点之间有一个 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性与 iNOS 基

因启动子的功能活性有关, 他们发现 iNOS 基因启动子为“+”等位基因时活性比启动子为“-”等位基因的活性高 25 倍. 认为在 iNOS 基因启动子 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性中, “+”等位基因携带者是 iNOS 基因高表达, 导致 2 型糖尿病患者出现并发症的原因. 本研究的结果与 Morris 的结果有相似之处, 即 iNOS 基因启动子多态性改变影响其功能活性. 为了区分 iNOS 基因启动子-969G→C 多态性中是否存在 iNOS 基因启动子 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性位点, 将构建的 iNOS 基因启动子-969G→C 位点多态性的荧光素酶报道基因重组质粒 pPGV-iNOSwt 和 pPGV-iNOSmt 测序的结果, 输入 GenBank 进行对比分析, 未发现有 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性相同序列. 提示 iNOS 基因启动子的这两个多态性都影响该基因启动子的功能活性.

4 参考文献

- 1 Jurgen FJ, Morduller KB, Lell B. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against Malaria. *Lancet* 1998;351:265-266
- 2 Morris BJ, Markus A, Glenn CL. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med* 2002;80:96-104

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

食管癌前病变和癌组织 P53 和 Rb 蛋白表达与年龄的关系

孙超, 王立东, 王启鸣, 李定国

孙超, 王立东, 王启鸣, 郑州大学医学院癌症研究室 河南省郑州市 450052
李定国, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092
国家杰出青年科学基金, No. 30025016
河南省高校创新人才工程基金
项目负责人: 王立东, 450052, 河南省郑州市大学路 75 号. 郑州大学医学院
癌症研究室. lidong0823@sina.com
电话: 0371-6970165 传真: 0371-6970165
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-07-06

摘要

目的: 探讨河南省食管癌高发区青年(≤ 40 岁)与中老年(≥ 50 岁)食管癌患者的 P53 和 Rb 蛋白表达变化特征及其意义.

方法: 采用免疫组化卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法和组织病理学方法, 分析 72 例青年和 73 例中老年患者食管鳞癌组织中 P53 和 Rb 蛋白的表达及其与病变程度和年龄之间的关系.

结果: 青年组和中老年组患者从正常食管上皮→基底细胞过度增生→间变→鳞状细胞癌演变过程中, 随着病变程度的

加重, P53 和 Rb 蛋白阳性表达率呈上升趋势, 青年组 P53 免疫阳性反应的百分率在正常上皮和各级病变组织中均低于中老年组(13% vs 47%, $\chi^2=19.162$, 21% vs 60%, $\chi^2=19.380$, 43% vs 93%, $\chi^2=16.512$, 36% vs 85%, $\chi^2=36.213$, 以上 P 值均 <0.01), 青年组 Rb 蛋白阳性表达率在正常上皮和各级病变组织中也均低于中老年组, 但二者无统计学差异($P>0.05$). 青年组 P53 和 Rb 表达共阳性率为 25%, 共阴性率为 49%, 二者表达具有明显的一致性 (Kappa 值=0.442, $P<0.01$).

结论: P53 和 Rb 可能共同参与青年患者食管上皮的癌变过程, 并在食管癌发生中发挥相互协同的作用; 该地区不同年龄组食管癌变过程中 P53 蛋白表达变化差异可能与其接触环境致癌原时间长短有关.

孙超, 王立东, 王启鸣, 李定国. 食管癌前病变和癌组织 P53 和 Rb 蛋白表达与年龄的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2222-2225
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2222.asp>